

538636

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

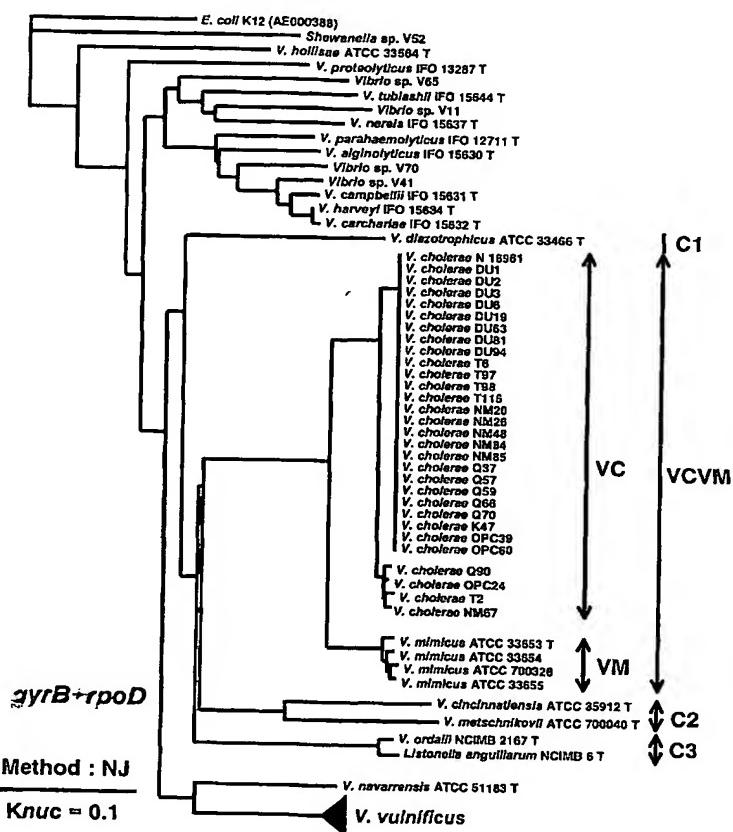
(10)国際公開番号
WO 2004/055188 A1

- (51) 国際特許分類7: C12N 15/31, C12Q 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015889
- (22) 国際出願日: 2003年12月11日 (11.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-362878
2002年12月13日 (13.12.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社ニチレイ (NICHIREI CORPORATION) [JP/JP];
- 〒104-8402 東京都中央区築地6丁目19番20号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小泉 雄史 (KOIZUMI,Takeshi) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 西山 葉子 (NISHIYAMA,Yoko) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 山本 敏 (YAMAMOTO,Satoshi) [JP/JP]; 〒261-8545 千葉県千葉市美浜区新港9番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 福山 正文 (FUKUYAMA,Masafumi) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県相模原市渕野辺1-17-71 麻布大学環境保健学部内 Kanagawa (JP). 古畠 勝則 (FURUHATA,Katsunori) [JP/JP]; 〒229-8501 神奈川県相模原市渕野辺1-17-71 麻布大学環境保健学部

[続葉有]

(54) Title: PRIMER AND PROBE FOR DETECTING VIBRIO CHOLERAE OR VIBRIO MIMICUS AND DETECTION METHOD USING THE SAME

(54) 発明の名称: ビブリオコレラ又はビブリオミミカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法



(57) Abstract: It is intended to construct a specific gene amplification primer with high performance for detecting, quantifying and identifying *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* which has a practically sufficient amplification efficiency and amplification specificity with little risk of misjudgment. Partial base sequences of rpoD genes and gyrB genes of *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* and species closely related thereto are determined and the genetic relationships among them are clarified. Then bases respectively specific to *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* are identified. Thus, it becomes possible to design a highly specific probe containing the same and a gene amplification primer having a high specificity and an excellent amplification efficiency.

(57) 要約: 誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な增幅効率と增幅特異性を有する、高性能なビブリオコレラ及びビブリオミミカス検出・定量・同定用特異遺伝子増幅プライマーを作製すること。本発明者等は、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスとその近縁種のrpoD遺伝子およびgyrB遺伝子の部分塩基配列を決め、その系統関係を明らかにし、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスそれぞれに特徴的な塩基を同定し、これを含む高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しつつ增幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することを可能とした。

WO 2004/055188 A1



内 Kanagawa (JP). 大仲 賢二 (OONAKA,Kenji) [JP/JP];
〒229-8501 神奈川県 相模原市 湘野辺1-17-71 麻布大
学 環境保健学部内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI,Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

ビブリオコレラ又はビブリオミミカスの検出用プライマー及びプローブ 並びにそれらを用いる検出方法

技術分野

本発明は、食品検査、疫学的環境検査、並びに臨床検査における、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスの検出・同定・計数方法に関するものである。

背景技術

ビブリオコレラは経口感染の後、コレラ毒素を產生し、激しい下痢と嘔吐を引き起こす。場合によっては、極度の脱水症状のため、死亡することもある感染症細菌である。ヒトに対し毒性を示すビブリオコレラは抗 O1 抗体で凝集する O1 コレラのみであり、それ以外の菌は O1 非凝集(O1-non-agglutinable)ということで NAG(ナグ)-ビブリオと分類され、人に対する毒性を示さないとされてきた。しかし、1995 年にインドのベンガル地方で、それまでのコレラと同じ様な症状を起こす O1 抗原を持たない新型のビブリオコレラが分離され、O139 という新しい O 抗原を持つことが明らかとなった。この株は、ベンガル株と呼ばれ、従来の O1 コレラと同様のコレラ毒素產生遺伝子を持ち、毒素を产生して、コレラ症を惹起することが明らかにされた。このことにより、O1 コレラ以外でもヒトに感染しコレラ症の原因となり得ることが示された。実際、O1、O139 以外のビブリオコレラにもコレラ毒素遺伝子を有する株が存在し、ヒトに対してコレラ症を引き起こす。しかしながら、O1 および O139 以外のビブリオコレラによる症状は行政上感染症として取り扱われない。

一方で、ビブリオコレラの非 O1 株の中に白糖非分解の株がまれに検出されていたが、Davis らが、ビブリオコレラとの DNA 相同性を調べることで、ビブリオコレラとはやや異なることを示しビブリオミミカスとした。このビブリオミミカスはビブリオコレラと非常に近い種であり、生化学的性状では白糖分解能が異なる（ビブリオコレラが陽性、ビブリオミミカスが陰性）が、それ以外の性状は非常

に似ていると報告されている (J. Clin. Microbiol. 14, 631-639 1981) (非特許文献 1)。ビブリオミミカスにはビブリオコレラと同様のコレラ毒素遺伝子を有する株が存在することが知られており (Microbiol Immunol 1998;42 823-828) (非特許文献 2)、コレラ症と同様の症状を引き起こす可能性がある。

他方、コレラ毒素遺伝子を持たないビブリオコレラの中に、腸炎ビブリオの病原因子である耐熱性溶血毒素遺伝子 (tdh) を持つ株 (Appl Environ Microbiol 52:1218-20, 1986) (非特許文献 3) や、大腸菌の耐熱性エンテロトキシンを產生する株 (J. Clin. Invest. 85:697-705, 1990) (非特許文献 4) の存在が報告されており、下痢症などの原因となり得る。さらに、ビブリオミミカスにも同様に tdh 遺伝子を有する株が存在することが知られており (FEMS Microbiol 59:319-23, 1990) (非特許文献 5) コレラ毒素を產生しない場合にも下痢症などの原因となり得る。

上述の如く、血清型が 01 及び 0139 (ベンガル) であり、コレラ毒素を產生するビブリオコレラが検出された場合には、“感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律”の定める措置の対象となる。さらに、01 コレラ及びベンガルコレラ以外のビブリオコレラにもコレラ毒素產生株が存在し、コレラ症と同様の症状を引き起こす。他方に、コレラ毒素非產生株であっても、コレラ症の原因とは成り得ないが、そのことが非病原性であることを意味するわけでは無く、コレラ毒素以外の毒素を產生することにより急性胃腸炎、下痢症などを惹起する。従って、ビブリオコレラ菌群を迅速かつ正確に検出することが求められる。

一方で、ビブリオミミカスにおいても、コレラ症の原因となり得るコレラ毒素を產生する株及びコレラ毒素以外の毒素を產生することにより急性胃腸炎、下痢症などの原因となり得る。故に、ビブリオミミカス菌群を迅速かつ正確に検出することも求められる。

生化学的手法を用いた従来の検査方法は、熟練した技術と多大な労力と時間を必要とする。この欠点を補うために、正確かつ迅速・簡便なビブリオコレラおよびビブリオミミカスの検出・同定を目的とした遺伝子による検査方法が試みられている。

コレラ症の原因であるコレラ毒素をコードする遺伝子を検出するプライマーが

既に存在する (J. Biol. Chem. 1983; 258, 13722-13726) (非特許文献 6)。しかしながら、当該プライマーでは、コレラ毒素遺伝子を有さずに別の毒素を產生するビブリオコレラ及びビブリオミミカスを検出することは出来ない。

一方、ビブリオコレラとビブリオミミカスの 16S rRNA 遺伝子塩基配列を全長で比較すると、1,456 塩基のうち 6 塩基しか異なる (Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 416-426 1994) (非特許文献 7) ために、明確に区別することは不可能であることから、ビブリオコレラとビブリオミミカスの 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region を比較し、ビブリオコレラとビブリオミミカスが分類可能であることを示し、ビブリオコレラのみを検出可能なプライマーを作成した報告 (Appl. Environ. Microbiol. 65, 2202-2208 1999) (非特許文献 8) も存在しているが、当該プライマーを用いた場合に、ビブリオミミカスを誤って検出してしまうとの報告も存在する (Appl. Environ. Microbiol. 67, 2360-2364 2001) (非特許文献 9)。

発明の開示

以上の様に、既存の遺伝子検出方法では、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスを精度よく検出することができない。

従来の遺伝子検査方法に共通しているのは、細菌の「種」が遺伝的な多様性を内包する集団である事を無視している点に有る。ある細菌集団のメンバーと推測される 1 菌株の塩基配列を、その集団共通の、あるいは代表する配列として用いる事は、中立的変異を速やかに蓄積する遺伝子の分子進化の性質上大変危険である。即ち、本来検出されるべき菌株がプライマー領域の僅かな変異の為に増幅が阻害されて検出されなかったり、プライマーの特異性が十分でないために検出されるべきでない近縁株が検出されるといった誤判定の原因になる事が危惧される。そこで、特異性のバックグラウンドが証明されており、誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオコレラおよびビブリオミミカスの検出・同定・定量用特異遺伝子増幅プライマー、さらにビブリオコレラ、ビブリオミミカスをそれぞれ特異的に検出・同定・定量する遺伝子増幅プライマーの作成が必要とされていた。

細菌のある系統群の遺伝子を特異的に検出する方法を作成する為には、検出し

ようとする生物群、ならびにその系統的に近縁な生物群の塩基配列をなるべく多数収集する必要がある。また、特異検出のターゲットとする遺伝子は、最も近縁の生物とも判別可能なように、十分に異なる塩基配列を有している必要がある。この為には、十分に早い進化速度を有していなくてはならない。また、高頻度に水平伝播する遺伝子（たとえば腸炎ビブリオの毒素遺伝子）の様に、系統とは無関係に存在する遺伝子は用いる事が出来ない。本発明でターゲットとして用いたgyrB 遺伝子及び rpoD 遺伝子がコードするタンパク質は、生存に必須なタンパク質である。この為、水平伝播し難く、また適度な進化速度を有しているため、細菌の系統解析に適している（Int. J. Syst. Bacteriol. 1998;48, 813-819, Int. J. Syst. Bacteriol. 1999;49, 87-95）。発明者らは、既にgyrB 遺伝子及び rpoD 遺伝子のPCR ダイレクトシーケンス法による簡便な塩基配列の決定方法を開発している（特開平 07-213229、特開平 08-256798）。さらに、発明者らは、既に多数のビブリオコレラを単離しており、他方に、公知のビブリオミミカス保存株及び、16S rRNA 配列に基づく解析により本菌に近縁であることが報告されている *Listonella anguillarum*, *V. ordalii*, *V. diazotrophicus*, *V. vulnificus*, *V. navarrensis*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatensis* (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1449-1456(2001)) について、表1に示される菌株のgyrB および rpoD 遺伝子の部分塩基配列を解析し、その配列に基づいた分子系統解析を行い、その系統関係を明らかとした。

表 1

表1. 使用した菌株

<i>V. Cholerae</i>	29株	臨床分離株	29株
<i>V. mimicus</i>	4株	ATCC 33653 T	
		ATCC 33654	
		ATCC 33655	
		ATCC 700326	
その他のビブリオ属保存株	52株		
<i>V. Vulnificus</i>	32株	ATCC 27562 T	
		ATCC 29306	
		ATCC 29307	
		ATCC 33147	
		ATCC 33148	
		ATCC 33149	
		ATCC 33814	
		ATCC 33815	
		ATCC 33816	
		ATCC 33817	
		ATCC 43382	
		ATCC BAA-86	
		ATCC BAA-87	
		ATCC BAA-88	
		ATCC BAA-89	
		ATCC BAA-90	
		JCM 3726	
		JCM 3727	
		JCM 3728	
		JCM 3729	
		JCM 3730	
		JCM 3731	
		環境分離株	10株
<i>V. diazotrophicus</i>		ATCC 33466 T	
<i>V. navarrensis</i>		ATCC 51183 T	
<i>V. metschnikovii</i>		ATCC 700040 T	
<i>V. cincinnatensis</i>		ATCC 35912 T	
<i>V. ordalii</i>		NCIMB 2167 T	
<i>Listonella anguillarum</i>		NCIMB 6 T	
<i>V. hollisae</i>		ATCC 33564 T	
<i>V. alginolyticus</i>		IFO 15630 T	
<i>V. campbellii</i>		IFO 15631 T	
<i>V. carchariae</i>		IFO 15632 T	
<i>V. harveyi</i>		IFO 15634 T	
<i>V. nereis</i>		IFO 15637 T	
<i>V. parahaemolyticus</i>		IFO 12711 T	
<i>V. proteolyticus</i>		IFO 13287 T	
<i>V. tubiashii</i>		IFO 15644 T	
<i>Vibrio. sp</i>	5株	食品由来分離株	

合計85株

即ち、供試菌株を 2%NaCl 添加ブレインハートインフュージョン培地で増菌培養した後に、PUREGENE DNA Isolation Kit(Gentra SYSTEMS)を用いて染色体 DNA

を抽出した。抽出したDNAを鋳型として、gyrB増幅ユニバーサルプライマーUP-1EおよびAprUを用いて約900bp(大腸菌K-12株上の塩基配列上のポジション331-1212;アミノ酸配列ではポジション111から404に相当する領域)のgyrB遺伝子断片をPCR増幅した。また同様にrpoD増幅ユニバーサルプライマー70F-M13および70R-M13を用いて約800bp(大腸菌K-12株上の塩基配列上のポジション334-1125;アミノ酸配列ではポジション112から375に相当する領域)のrpoD遺伝子断片をPCR増幅した。得られたPCR産物は、1%アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色し紫外線照射下でその存在を確認した後にWizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)を用いて精製しシーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、ユニバーサルプライマーに予め付加してあるM13R、M13-21配列をプライマーとして用いABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)にて配列を解析した。決定した塩基配列を用いて分子系統解析を行うにあたり、ビブリオコレラおよびミミカスの近傍をより正確に把握することを目的として、gyrBおよびrpoD遺伝子部分配列を結合させ解析を実施した。得られた塩基配列を、CLUSTAL Wコンピュータープログラムで多重アラインメント解析を行った後、PHYLIPコンピュータープログラムパッケージを用い、木村の2パラメーターモデルで算出した遺伝的距離に基づいて近隣結合法により分子系統樹を作成した。この結果、ビブリオコレラ及びミミカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属することが明らかとなった。さらに、ビブリオコレラ及びミミカスもそれぞれが独立した系統群を形成していることが示された。(図1)そこで、ビブリオコレラ及びミミカス菌群のみを検出可能な遺伝子検査法を確立するために、まず、近縁種間の塩基配列の差異を明らかとした。即ち、ビブリオコレラ及びミミカス群内では保存され、他のビブリオ属細菌とは異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオコレラ及びミミカスが属する系統群のコンセンサス配列を求めると共に、分子系統解析の結果から本系統に近縁であることが判明した図1中C1~C3の系統のコンセンサス配列を比較し、系統特異的情報図を作成した(図2、3)。図2より、gyrB遺伝子においては、配列表中の配列番号1の位置番号(以

下塩基番号とも言う) 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 の位置、図 3 より、*rpoD* 遺伝子においては配列表中の配列番号 2 の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 の位置がビブリオコレラ及びミミカスが属する系統に特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含む本系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しあつ增幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の *gyrB* 及び *rpoD* 遺伝子の塩基配列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上 40 塩基以下の連続する *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を含むプライマーを設計することが可能となる。同様に、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上で 100 塩基以下の連続する *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の塩基配列を含むようにプライマーを設計することが可能となる。さらに、当該プライマー及びプローブの作成には、上記相違塩基を 2 以上の高頻度で含む領域、例えば、*gyrB* 遺伝子においては、96、107 を含む領域、258、270、279、285 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、543、552、557 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、690、702、714 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、729、733、734 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、759、771 を含む領域、782、786、792、795 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、*rpoD* 遺伝子においては、66、67、75、90 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、177、178、180、186 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、223、227、228、231 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、250、251、255、257、259、264 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、300、301、302、303、305、313、314 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、362、369、373、374、

380 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、400、402、409、410、415、416 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、423、427、433、444、447 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、504、510、513 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、543、556、558 のいずれかの位置を 2 以上含む領域、747、757、762、763 のいずれかの位置を 2 以上含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3 ‘末端がビブリオコレラ及びミミカス菌群に特異的な塩基であることが望ましい。本件発明は、これらプライマー及びプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオコレラおよびミミカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

他方、ビブリオコレラ及びミミカス菌群はさらに、ビブリオコレラ菌群とビブリオミミカス菌群が独立した系統を形成した（図 1）ことから、ビブリオコレラ及びミミカス菌群をそれぞれ検出可能な遺伝子検査法を確立するために、先と同様に、ビブリオコレラ及びミミカス群内でそれぞれ保存された領域、及び互いに異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオコレラ及びミミカスが属する各系統群のコンセンサス配列を、互いに比較することで系統特異的情報図を作成した（図 4、5、6、7）。ビブリオコレラが属する系統においては、gyrB 遺伝子の場合、図 4 より、配列表中の配列番号 3 の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 の位置、rpoD 遺伝子においては図 5 より配列表中の配列番号 4 の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 の位置が特異的であることが明らかとなった。また、ビブリオミミカスが属する系統においては、gyrB 遺伝子の場合、図 6 より、配列表中の配列番号 5 の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 の位置、rpoD 遺伝子においては、図 7 より、配列表中の配列番号 6 の位置番号 12、93、96、105、114、115、

116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、25
5、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、
445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、57
0、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、
687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は
804 の位置が特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含むビブ
リオコレラ又はビブリオミミカスが属する系統に特異的な配列を用いることによ
り、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しあつ增幅効率に優れた遺伝子
増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、ビブリオコレラとビブリ
オミミカスの塩基が相違する位置を必ず含むように、当該 2 菌種が相違する塩基
を含む連続する 15 塩基以上の gyrB および rpoD 遺伝子の塩基配列、好適には 20
塩基以上、更に好適には 20 塩基以上 40 塩基以下の連続する gyrB および rpoD 遺
伝子の塩基配列を含むプライマーを設計することが可能となる。同様に、ビブリ
オミミカスとビブリオコレラの塩基が相違する位置を必ず含むように、当該 2 菌
種が相違する塩基を含む連続する 15 塩基以上の gyrB および rpoD 遺伝子の塩基配
列、好適には 20 塩基以上、更に好適には 20 塩基以上で 100 塩基以下の連続する
gyrB および rpoD 遺伝子の塩基配列を含むプローブを設計することが可能となる。
さらに、当該プライマー及びプローブの作成には、上記相違塩基を 2 以上の高頻
度で含む領域、例えば、gyrB 遺伝子においては、36、39、42、45、48、51 のいづ
れかの位置を 2 以上含む領域、285、291、306 のいづれかの位置を 2 以上含む領
域、384、390、399 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、867、873、879、882、8
85 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、rpoD 遺伝子においては、93、96、105、1
14、115、116、117 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、126、132、141 のいづれ
かの位置を 2 以上含む領域、216、222、231、240 のいづれかの位置を 2 以上含む
領域、252、254、255、260、261、264 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、276、
285、291 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、327、333、342、345 のいづれかの
位置を 2 以上含む領域、424、426、432、441、445、446 のいづれかの位置を 2 以
上含む領域、448、450、453、468 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、489、495、
501 のいづれかの位置を 2 以上含む領域、519、522、525、540 のいづれかの位置

を2以上含む領域、585、591、600、603、606のいずれかの位置を2以上含む領域、639、645、654、657のいずれかの位置を2以上含む領域、666、675、679、680、681、687のいずれかの位置を2以上含む領域、702、705、708、714、720、723のいずれかの位置を2以上含む領域、729、732、741、750のいずれかの位置を2以上含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3'末端がビブリオコレラ又はビブリオミミカスに特異的な塩基であることが望ましい。

具体的には、ビブリオコレラ及びミミカス菌群を検出、定量又は同定用のプライマーとしては、

(1) *gyrB* 遺伝子については、配列番号1の位置番号96、107の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号258、270、279、285のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号543、552、557のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号690、702、714のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号729、733、734のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖含む遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号759、771の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号782、786、792、795のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-tycaywscscaaacttacca-3'又は対応する相補鎖、5'-gaaytctggcggtcgatcaag-3'又は対応する相補鎖、5'-catrttagttgttcaaagtacgg-3'又は対応する相補鎖、5'-ggatttacytccgaagaaacyagc-3'又は対応する相補鎖、5'-ygccagcttcattcatr-3'又は対応する相補鎖、5'-cgcttcgcttgggtttcc-3'又は対応する相補鎖、及び5'-caataatctcgaacaaacgt-3'又は対応する相補鎖のいずれかである遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

(2) *rpoD* 遺伝子については、配列番号2の位置番号66、67、75、90のいずれ

か 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 177、178、180、186 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 223、227、228、231 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 250、251、255、257、259、264 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 300、301、302、303、305、313、314 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 362、369、373、374、380 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 400、402、409、410、415、416 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 423、427、433、444、447 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 504、510、513 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 2 の位置番号 543、556、558 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、又は配列番号 2 の位置番号 747、757、762、763 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-gattgctgagtatcctggaccatc-3' 又は対応する相補鎖、5'-gaycctaacgacatggaaacc-3' 又は対応する相補鎖、5'-ttcwg
arctytctgaagcs-3' 又は対応する相補鎖、5'-agatgaygmkgtcgysgar-3' 又は対応する相補鎖、5'-cgacggtgaaagyagcgacag-3' 又は対応する相補鎖、5'-caatgaa
ctgcgcggyaagtt-3' 又は対応する相補鎖、5'-gtcacgaccaaattattaac-3' 又は対応する相補鎖、5'-gyytgamgcttcagawgcttgrtka-3' 又は対応する相補鎖、5'-y
ggttgcagagttcaacc-3' 又は対応する相補鎖、5'-catyaccaarcgytcttgg-3'
又は対応する相補鎖、及び 5'-cgytcaacacagacagtgawgtc-3' 又は対応する相補鎖

のいずれかである遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

ビブリオコレラ用プライマーとしては、

(1) *gyrB*については、配列番号 3 の位置番号 36、39、42、45、48、51 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 3 の位置番号 285、291、306 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 3 の位置番号 384、390、399 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 3 の位置番号 867、873、879、882、885 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-ggtggttaacgcgctytct-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-ycgatgaacgtgaagaagataaa-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tgagaaaagtcttccacttt-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gttaaagtggaagactttc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び 5'-gggtaagccwgcaagatcc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

(2) *rpoD*については、配列番号 4 の位置番号 93、96、105、114、115、116、117、のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 126、132、141 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 216、222、231、240 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 252、254、255、260、261、264 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 276、285、291 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 327、333、342、345 のいずれか 2 以上の位置の

塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 424、426、432、441、445、446 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 448、450、453、468 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 489、495、501 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 519、522、525、540 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 585、591、600、603、606 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 639、645、654、657 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 679、680、681、687、702 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 705、708、714、720、723 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 4 の位置番号 729、732、741、750 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、が挙げられる。より具体的には、5'-attctttagcagttgtatcg-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-caggccgaagagctacgtctc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tgagcttctgaagcggatctcg-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gaagatgatgctgtcgaa-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gaagatgaagacgaagat-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-cggtatcgaccctgaactg-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-catcaagcttctgaagcgtcaga-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tcaaccaagtggtcgaattgc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-acggaagatatccarcaactaa-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gcgaacacgatccattgaagtgc-3' 又は

対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gatgaacgatttttcggcatc-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-aaggacttatccagccac-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-ttcttcttgctcacggactttcg-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-ttctgaattgaacggcgatc-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び5'-tgtctttgctcgatcatgtt-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

ビブリオミミカス用プライマーとしては、

(1) gyrBについては、配列番号5の位置番号36、39、42、45、48、51のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号285、291、306のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号384、390、399のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号867、873、879、882、885のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。より具体的には、5'-ggtagtgaatgccctgtca-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-cggatgagcgtgaagaagataag-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tggaaaagtattccacttc-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gttgaagtggaataacttt-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び5'-wggcaaaccagckarrtct-3'又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

(2) rpoDについては、配列番号6の位置番号93、96、105、114、115、116、117、のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号126、132、141のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号216、222、231、240のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子

増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 252、254、255、260、261、264 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 276、285、291 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 327、333、342、345 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。配列番号 6 の位置番号 424、426、432、441、445、446 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 448、450、453、468 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 489、495、501 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、位置番号 519、522、525、540 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 585、591、600、603、606 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 639、645、654、657 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 679、680、681、687、702 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 705、708、714、720、723 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、配列番号 6 の位置番号 729、732、741、750 のいずれか 2 以上の位置の塩基を含む連続する 15 塩基以上の鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー、が挙げられる。より具体的には、5'-cattcttgaacagttgacaag-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-caggcagaagaactacgtctg-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-agarctctctgaaggccgatctcgct-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gaagatgacgaggtcgcggag-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gaggatgaagatgaagac-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、

幅プライマー、5'-'gggtattgaccctgagctc-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'taaccaaggcatctgaagcttcaag-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'tcaacccaaatggtcaaattgt-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'gcggaaaratatccagtaccag-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'acgaacacgatccatcgaggta-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'aataaatgatttctttggcatt-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'gagyactttatcragccat-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'gtcttcttgctcacgtacttttg-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-'ttggattgaagggcgaata-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、及び 5'-'agtctcytgttcgatcatctgm-3' 又は対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、並びに上記配列からなる鎖又は相補鎖を含む遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

上記した領域、上記した配列からなる鎖又はその相補鎖自身をプライマーとして用いることができるほか、必要に応じ、アダプター配列等の他の配列をプライマーに含めることができる。

本件発明は、これらプライマー及びプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオコレラ又はミミカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

本発明で用いる遺伝子増幅方法は、PCR 法に限定されない。プライマーの特異性に基づく特異増幅方法、あるいは増幅の特異的阻害方法に用いる事が可能である。また、同様に特異増幅プライマーと標識特異プローブの組み合わせによる定量増幅反応にも用いる事が出来る。また、プローブ配列は単独で用いる事も可能である。その使用方法は、固相あるいは液相に限定されない。サイバーグリーンなどの増幅した二本鎖 DNA を検出する試薬を用いて行うリアルタイム PCR や FRET 等を応用したリアルタイム PCR を行う際のプライマー及びプローブとしても利用可能である。

本発明で得られた塩基配列の系統間特異性情報（図 2、3、4）を用いる事によって、高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しあつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計する事が可能となった。本発明で得られたビブリオコレラまたはビブリオミミカス特異的塩基情報（図 2、3、4）を基に作成した PC

R プライマーの配列を表 2 に示す。

表 2

表2. *V. cholerae*, *V. mimicus*特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	CMgF	gaaytctggcggtcgatcaag	22	258 - 279	センス
	CMgR	catrtagttttcaaagtacgg	22	564 - 543	アンチセンス
<i>rpoD</i>	CMrF	gaycctaacgacatggaaacc	21	166 - 186	センス
	CMrR	gtcacgaccaaatttcattaac	21	420 - 400	アンチセンス

また、系統群としての情報を得ているため、解析した配列上のほぼ全長にわたって、この様な特異プライマーあるいはプローブを設計する事が可能である。

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。実施例はその1様体であり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-362878 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、gyrB および rpoD 遺伝子の部分配列を繋ぎ合わせた後に分子系統解析を行った結果を示した図。この図が近隣結合法による分子系統樹であり、ビブリオコレラ及びミミカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属していることを示している。さらに、ビブリオコレラ及びミミカスもそれぞれが独立した系統群を形成していることを示している。

図2は、図1で示したビブリオコレラおよびミミカスが属するクラスターのgyrB 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1,2,3）のgyrB 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラおよびミミカスに特異的な塩基であることを示す。

図3は、図1で示したビブリオコレラおよびミミカスが属するクラスターのrpoD 遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1,2,3）のrpoD 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラおよびミミカスに特異的な塩基であることを示す。

図4は、図1で示したビブリオコレラが属するクラスターのgyrB 遺伝子のコンセンサス配列（上段）とミミカスが属するクラスターのgyrB 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラに特異的な塩基であることを示す。

図5は、図1で示したビブリオコレラが属するクラスターのrpoD 遺伝子のコンセンサス配列（上段）とミミカスが属するクラスターのrpoD 遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラに特異的な塩基であることを示す。

図6は、図1で示したビブリオミミカスが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（上段）とビブリオコレラが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオミミカスに特異的な塩基であることを示す。

図7は、図1で示したビブリオミミカスが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（上段）とビブリオコレラが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオミミカスに特異的な塩基であることを示す。

発明を実施するための最良の形態

[実施例1]

本発明により得られた、ビブリオコレラおよびミミカスに特異的である領域を用いて設計した表2に示された遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。尚、請求項5の(2)、請求項5の(3)、請求項11の(2)、および請求項11の(7)に記載のプライマーはそれぞれ表2中のCMgF、CMgR、CMrFおよびCMrRに相当する。供試菌株から抽出した染色体DNAを鑄型としたPCRを行った。PCRはAmpliTaq Gold((PE Applied Biosystems)を用いて、合計20μlの反応液で行った。サーマルサイクラーの条件は、95°C10分の加熱後に94°C1分、アニール(アニール温度は表5参照)1分、72°C1分を35サイクル行い、最後に72°C10分の伸長反応を行った。反応後のサンプルは、1%アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色し紫外線照射下で遺伝子の増幅の有無を確認した。gyrB遺伝子を標的としたCMgFとCMgR、rpoD遺伝子を標的としたCMrFとCMrRのどちらの組み合わせにおいても、ビブリオコレラ及びミミカスに属するとされた菌株由来のDNAからのみ増幅産物が確認された(表6)。

[実施例2]

本発明により得られた、ビブリオコレラまたはミミカスに特異的である領域を用いて設計した表3、4に示された遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。尚、請求項19の(1)、請求項19の(3)、請求項19の(4)、請求項19の(5)、請求項25の(1)および請求項25の(14)に記載のプライマーはビ

ブリオコレラ特異的プライマーであって、それぞれ表 3 中の CF1、CF2、CR2、CR1、CrF1 および CrR1 に、さらに請求項 33 の (1)、請求項 33 の (3)、請求項 33 の (4)、請求項 33 の (5)、請求項 39 の (7) および請求項 39 の (13) に記載のプライマーはビブリオミミカス特異的であってそれぞれ表 4 中の MF1、MF2、MR2、MR1、MrF1 および MrR1 に相当する。

実施例 1 と同様に、供試菌株から抽出した染色体 DNA を鑄型とした PCR を行った（アニール温度は表 5 参照）。いずれの場合も、ビブリオコレラに特異的なプライマーはビブリオコレラのみを、ビブリオミミカスに特異的なプライマーはビブリオミミカスのみから増幅産物が検出された（表 6）。

表 3

表3. *V. cholerae*特異検出用プライマー

標的遺伝子 プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	gggtggtaaacgcgcttct	19	33 - 51	センス
	gttaaagggtgaagactttc	19	402 - 384	アンチセンス
	ttagaaaaagtcttccacttt	19	381 - 399	センス
<i>CrF1</i>	gggttaaggccwgcagaatcc	19	885 - 867	アンチセンス
	attctttagcagtttgatcggt	21	97 - 117	センス
<i>rpoD</i>	ttctgaatttgaacggcgatc	21	725 - 705	アンチセンス

表4

表4. *V. mimicus*特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	MF1	ggtagtgaatgccctgtca	19	33 - 51	センス
	MR2	gttgtaaagtggaaatacttt	19	402 - 384	アンチセンス
	MF2	taaaaaagttttccacttc	19	381 - 399	センス
<i>MrF1</i>	MR1	wggcaaaccaggckarrct	19	885 - 867	アンチセンス
<i>rpoD</i>	MrF1	taaccaaggcatctgaaagcttcaag	24	423 - 446	センス
	MrR1	gtttttttgtctcacgttttttg	24	702 - 679	アンチセンス

表 5

表5. *V. cholerae*, *V. mimicus*特異検出用プライマ-PCR条件

PCR条件						
標的遺伝子	センスプライマー	アンチセンスプライマー	増幅産物(bp)	アニール温度(°C)	サイクル数	プライマー濃度(μM)
<i>gyrB</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i>)	CMgF	CMgR	307	60	35	0.1
<i>rpoD</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i>)	CMrF	CMrR	255	60	35	0.1
<i>gyrB</i> (<i>V. cholerae</i>)	CF1	CR2	370	65	35	0.1
	CF2	CR1	505	60	35	0.1
<i>rpoD</i> (<i>V. cholerae</i>)	CrF1	CrR1	629	65	35	0.1
<i>gyrB</i> (<i>V. mimicus</i>)	MF1	MR2	370	65	35	0.1
	MF2	MR1	505	60	35	0.1
<i>rpoD</i> (<i>V. mimicus</i>)	MfF1	MfR1	280	65	35	0.1

表 6

連番	名 称	株 名 称	血清型	コレラ毒素 遺伝子		CMrF& CMrR	CF1& CR2	CF2& CR1	CrF1& CrR1	MF1& MR2	MF2& MR1	MrF& MrR1
				CMrF	CMrR							
1	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29306		-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29307		-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147		-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33148		-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33149		-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33814		-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33815		-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33816		-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33817		-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 43382		-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-86		-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-87		-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-88		-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-89		-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-90		-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3726		-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3727		-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3728		-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3729		-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3730		-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3731		-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>V. vulnificus</i>	No.4		-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	<i>V. vulnificus</i>	No.9		-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	<i>V. vulnificus</i>	No.68		-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	<i>V. vulnificus</i>	No.74		-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>V. vulnificus</i>	No.81		-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	<i>V. vulnificus</i>	No.130		-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	<i>V. vulnificus</i>	No.196		-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	<i>V. vulnificus</i>	No.202		-	-	-	-	-	-	-	-	-

PCR												
連番	名 称	株 名 称	血清型	コレラ毒素 遺伝子	CMgF& CMgR	CMFF& CMfR	CF1& CR2	CF2& CR1	CrF1& CR1	MF1& MR2	MF2& MR1	MF1& MR1
31	<i>V. vulnificus</i>	No.498		-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	<i>V. vulnificus</i>	No.965		-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	<i>V. cholerae</i>	DU1	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
34	<i>V. cholerae</i>	DU2	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35	<i>V. cholerae</i>	DU3.	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
36	<i>V. cholerae</i>	DU6	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
37	<i>V. cholerae</i>	DU19	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
38	<i>V. cholerae</i>	DU63	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
39	<i>V. cholerae</i>	DU81	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
40	<i>V. cholerae</i>	DU94	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
41	<i>V. cholerae</i>	T2	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
42	<i>V. cholerae</i>	T6	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
43	<i>V. cholerae</i>	T97	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
44	<i>V. cholerae</i>	T98	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
45	<i>V. cholerae</i>	T116	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
46	<i>V. cholerae</i>	NM20	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
47	<i>V. cholerae</i>	NM26	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
48	<i>V. cholerae</i>	NM48	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
49	<i>V. cholerae</i>	NM67	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
50	<i>V. cholerae</i>	NM84	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
51	<i>V. cholerae</i>	NM85	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
52	<i>V. cholerae</i>	Q37	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
53	<i>V. cholerae</i>	Q57	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
54	<i>V. cholerae</i>	Q59	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
55	<i>V. cholerae</i>	Q66	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
56	<i>V. cholerae</i>	Q70	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
57	<i>V. cholerae</i>	Q90	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
58	<i>V. cholerae</i>	K47	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
59	<i>V. cholerae</i>	OPC24	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
60	<i>V. cholerae</i>	OPC39	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	-

連番	名 称	株 名 称	血 清 型	コレラ毒素 遺伝子	CMgF& CMgR	CMrF& CMrR	CF1& CR2	CF2& CR1	CrF1& CrR1	MF1& MR2	MF2& MR1	P C R	
												MrF1& MrR1	MrF1& MrR1
61	<i>V. cholerae</i>	OPC60	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
62	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33563 T		-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
63	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33654		-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
64	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33655		+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
65	<i>V. mimicus</i>	ATCC 700326		+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
66	<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33486 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	<i>V. navarrensis</i>	ATCC 51183 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	<i>V. metschnikovii</i>	ATCC 700040 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	<i>V. cincinnatensis</i>	ATCC 35912 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	<i>V. ordalii</i>	NCIMB 2167 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	<i>Listonella anguillarum</i>	NCIMB 6 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	<i>V. alginolyticus</i>	IFO 15630 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	<i>V. carchariae</i>	IFO 15632 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	<i>V. harveyi</i>	IFO 15634 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	<i>V. neris</i>	IFO 15637 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	<i>V. proteolyticus</i>	IFO 13287 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	<i>V. tubiashii</i>	IFO 15644 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	<i>Vibrio</i> sp.	V11		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	<i>Vibrio</i> sp.	V41		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	<i>Shewanella</i> sp.	V52		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	<i>Vibrio</i> sp.	V65		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	<i>Vibrio</i> sp.	V70		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	<i>V. hollisae</i>	ATCC 33564 T		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本件発明の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子プライマー及びプローブは、ビブリオコレラおよびビブリオミミカスの系統関係を把握した上で設計したものであるため、特異性を向上させる検討が行われており、検出精度という点で優れている。従って、食品、臨床検体などから菌を単離せず、近縁細菌種が供給している状況で直接検出する場合に有利になる。

請求の範囲

1. 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) の断片でビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 (塩基番号とも言う) 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 1 で表される遺伝子断片。

2. 請求項 1 記載の断片を含む配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

3. 請求項1で指定されたビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な位置を2位置以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

4. 3 ‘末端の塩基が該ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な請求項1で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項2記載の遺伝子増幅プライマー。

5. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 '-tycaywcsc aaacttacca- 3' 若しくは対応する相補鎖、
(2) 5 '-gaaytctggcggtcgatcaag- 3' 若しくは対応する相補鎖、
(3) 5 '- catrta gttgttcaaagtacgg- 3' 若しくは対応する相補鎖、
(4) 5 '- ggattt yacytccgaaagaacyagc - 3' 若しくは対応する相補鎖、
(5) 5 '- ygccagcttcattcatr - 3' 若しくは対応する相補鎖、
(6) 5 '-cgcttcgcttgggtttcc- 3' 若しくは対応する相補鎖、又は
(7) 5 '-caataatcttcgaacaaacgt- 3' 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

6. 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ及びビブリオミミカス検出、定量又は同定用プローブ。

7. 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメレース σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 2 で表される遺伝子の断片。

8. 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメレース σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

9. 請求項 8 で指定されたビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 位置以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子増幅プライマー。

10. 3 ‘末端の塩基が該ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な請求項 8 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子増幅プライマー。

1 1 . 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 ‘-gattgctgagtatcctggaaccatc- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-gaycctaacgacatggaaacc- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-ttcwgarctytctgaagcs- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-agatgaygmkgtcgysgar- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘-cgacggtgaaagyagcgacag- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5 ‘-caatgaactgcgcggyaagtt- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5 ‘-gtcacgaccaaattcattaac- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5 ‘-gyytgamgcttcagawgcttgrtka- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (9) 5 ‘-ygargtrcgcagagttcaacc- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (10) 5 ‘-catyaccaarcgytcttgg- 3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
- (11) 5 ‘-cgytcaacagacagtgawgtc- 3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項 8 項記載の遺伝子増幅プライマー。

1 2 . 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメレース σ 70 因子をコードする遺伝子 (*rpoD*) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む連続する 1 5 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

1 3 . 請求項 2 – 6 、又は 8 – 1 2 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定する方法。

1 4 . 請求項 2 – 6 、又は 8 – 1 2 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定するキット。

1 5 . 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードす

る遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 3 で表される遺伝子の断片。

16. 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

17. 3'末端の塩基がビブリオコレラ菌群に特有な請求項 16 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 16 記載の遺伝子増幅プライマー。

18. 請求項 16 で指定されたビブリオコレラ菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 16 記載の遺伝子増幅プライマー。

19. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5'-ggtggttaacgcgctytct-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5'-ycgatgaacgtgaagaagataaa-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5'-tgagaaaagtcttccacttt-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5'-gttaaagtggaagactttc-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (5) 5'-gggtaagccwgcaagatcc-3' 若しくは対応する相補鎖、のいずれかを含む請求項 16 項記載のプライマー。

20. 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ菌群検出、定量又は同定用プローブ。

21. 配列表中の配列番号 4 の RNA ポリメラーゼ σ 70 因子をコードする遺伝

子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 4 で表される遺伝子の断片。

22. 配列表中の配列番号 4 の RNA ポリメレース σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

23. 3 ‘末端の塩基が該ビブリオコレラ菌群に特有な請求項 22 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 22 記載の遺伝子増幅プライマー。’

24. 請求項 22 で指定されたビブリオコレラ菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 22 記載の遺伝子増幅プライマー。

25. 遺伝子増幅プライマーが、

- (1) 5 ‘-attcttgaggcagttgatcg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-caggccgaagagctacgtctc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-tgagcttctgaagcggatctcgcg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-gaagatgatgctgtcgtaaa-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘-gaagatgaagacgaagat-3’ 若しくは対応する相補鎖、

- (6) 5'-cggtatcgaccctgaactg-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5'-catcaagttctgaagcgtcaga-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5'-acggaagatccarcaactaa-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (9) 5'-tcaaccaagtggtcgaattgc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (10) 5'-gcgaacacgatccattgaagtg-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (11) 5'-gatgaacgatttctcggcatc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (12) 5'-aaggactttatccagccac-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (13) 5'-ttcttcttgctcacggacttcgc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (14) 5'-ttctgaattgaacggcgatc-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (15) 5'-tgtctttgctcgatcattgt-3' 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項22記載の遺伝子増幅プライマー。

26. 配列表中の配列番号4のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ菌群検出、定量又は同定用プローブ。

27. 請求項16-20、又は22-26のいずれか1項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ菌群を検出、定量又は同定する方法。

28. 請求項16-20、又は22-26のいずれか1項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ菌群を検出、定量又は同定するキット。

29. 配列表中の配列番号5のDNAジャイレース β サブユニットをコードする遺伝子(gyrB)中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号

5で表される遺伝子の断片。

30. 配列表中の配列番号3のDNAジャイレースβサブユニットをコードする遺伝子(gyrB)中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

31. 請求項30で指定されたビブリオミミカス菌群に特有な位置を2以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項30記載の遺伝子増幅プライマー。

32. 3'末端の塩基が該ビブリオミミカス菌群に特有な請求項31で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項30記載の遺伝子増幅プライマー

33. 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5'-ggtagtgtaatgcctgtca-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5'-cggatgagcgtgaagaagataag-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5'-tgaaaaagtattccacttc-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5'-gttgaagtgaaatacttt-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (5) 5'-wggcaaaccagckarrtct-3' 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項30記載の遺伝子増幅プライマー。

34. 配列表中の配列番号5のDNAジャイレースβサブユニットをコードする遺伝子(gyrB)中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオミミカス菌群検出、定量又は固定用プローブ。

35. 配列表中の配列番号6のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、

432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 6 で表される遺伝子の断片。

36. 配列表中の配列番号 6 の RNA ポリメラーゼ σ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795 又は 804 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含む遺伝子増幅プライマー。

37. 請求項 36 で指定されたビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 36 記載の遺伝子増幅プライマー。

38. 3 ‘末端の塩基が該ビブリオミミカス菌群に特有な請求項 36 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 36 記載の遺伝子増幅プライマー。’

39. 遺伝子プライマーが

- (1) 5 ‘-cattcttgaacagttgacaag- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-caggcagaagaactacgtctg- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-agarctctctgaagccgatctcgct- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-gaagatgacgaggtcgcggag- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘-gaggatgaagatgaagac- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5 ‘-gggtattgaccctgagctc- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5 ‘-taacaaagcatctgaagcttcaag- 3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5 ‘-gcggaaratatccagtaccag- 3’ 若しくは対応する相補鎖、

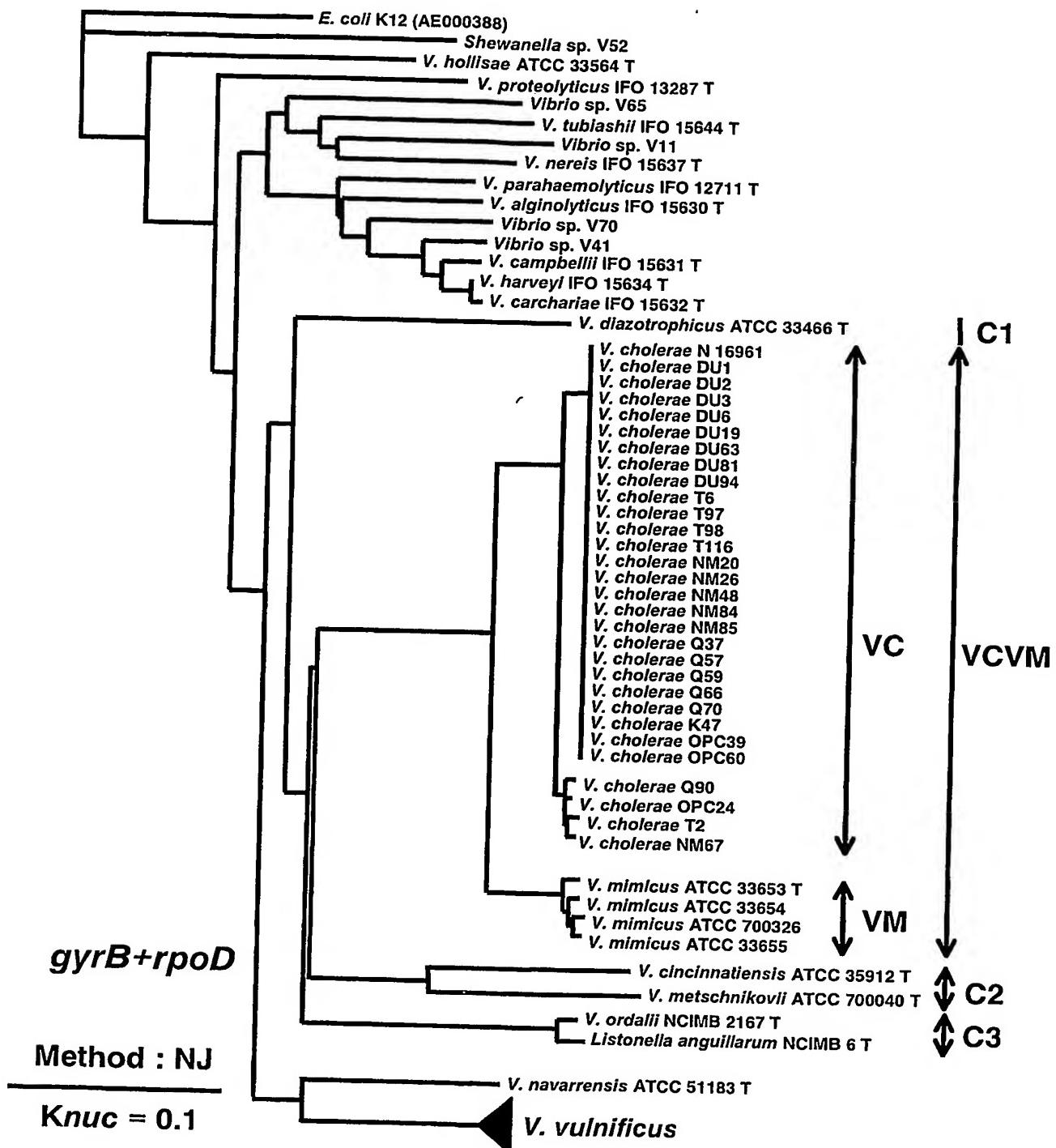
- (9) 5'-tcaaccaaatggtcaaattgt-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (10) 5'-acgaacacgatccatcgaggta-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (11) 5'-aataaatgattctttggcatt-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (12) 5'-gagyyactttatcragccat-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (13) 5'-gtcttcggctcacgtacttttg-3' 若しくは対応する相補鎖、
- (14) 5'-ttggattgaagggcgaata-3' 若しくは対応する相補鎖、又は
- (15) 5'-agtctcytgtcgatcatctgm-3' 若しくは対応する相補鎖のいずれかを含む請求項36記載の遺伝子増幅プライマー。

40. 配列表中の配列番号6のRNAポリメラーゼ σ 70因子をコードする遺伝子(rpoD)中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上を含む鎖又はその相補鎖を含むビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

41. 請求項30-34、又は36-40のいずれか1項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定する方法。

42. 請求項30-34、又は36-40のいずれか1項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定するキット。

☒ 1



☒ 2

VCVM-gyrB.con	1	GTMTCGGYGGTCTRCACGGGGTAGGGTGTGGTRGTTKAAYGCSCTBTCWGAAGAAGTG	60
3,4,5,gyrB.con	1	..H..N..T..Y...C..N..K..N..B..Y..C..VY.D.....D	60
	** * * * *	*** *	
VCVM-gyrB.con	61	CTRCTBACCATYATCGGYGGCAARATYCAYWCSCAAACTTACCATCAYGGTGTGCCA	120
3,4,5,gyrB.con	61	Y.DY.R..Y...Y.Y...RR...HMMH.YB...A.W....B..YYGY....B..D..W	120
	* * * * *	*** *	
VCVM-gyrB.con	121	CAAGCACCCGTTGKCTGTRGGTGGAKACWGAGCGTACCGGTACTACGGTCTGG	180
3,4,5,gyrB.con	121B..VY.RRSB..K..B..W..D..B..WMRH..H..D..W..VB.D..Y..Y..	180
	**** * * *	*** *	
VCVM-gyrB.con	181	CCWAGYGCACARACYTTACCAATATCGAACATTACGACATTGGCTAACGYCTG	240
3,4,5,gyrB.con	181	..R..T..HG..V..B..Y....Y..Y....C..Y..Y..H....D....R...Y.R	240
	** * * * *	*** *	
VCVM-gyrB.con	241	CGTGAGCTGTCATTCCCTGAAYTCTGGCGTGTGATCAAGCTGAYSGATGARCCTGAAGAA	300
3,4,5,gyrB.con	241	..Y..R..B..W..YY.A..C..W..B..H..V..YMRWY.RHWW.....H....MR	300
	** * * * *	*** *	
VCVM-gyrB.con	301	GATAARAAGACCACTTYATGATGAAAGGKGTTATTCAAGCGTTGTKACCCACTTGAAAC	360
3,4,5,gyrB.con	301	..Y..AM..M..Y..Y....KR.....K..YMR...R..Y...RSY..YY.H..Y	360
	** * * *	*** *	
VCVM-gyrB.con	361	CGYAAYAAACGCCRATCCATGARAAGTMTCCACTTYAACCAAGAGCGGTGAAGATGGC	420
3,4,5,gyrB.con	361	..C.....K..S..Y....V.....R.....Y....RYMW..V.....M..Y..B	420
	*** * * * * *	*** *	

卷之二

[3]

VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	1 1	ACACGTGAAGGYGAATCGATATTGCCAAGGCCATTGAAAGATGGTATTAAACCAAGTCAA ...T..Y....T..R..Y.....Y..K..R..Y..Y.....W.....Y.....W...	60 60
VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	61 61	AGTGGCATTGCTGAGTATCCTGGAAACCATCCWTAAYATTCTTGARCAGTTGAYMRKGTT M.Y..HG.K....A..Y..H..H..N..T.....YY.W.....R..Y...AAA...	120 120
VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	121 121	CAGGCMGAAGARCTAACGTCTSACTGAYCTGATTTCWGTTTCGTTGAYCCTAACGACATG .WW..W..R...Y..W..YY.A..M..M..V..YWSH.....YR.H.....DR.YKMWGWT	180 180
VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	181 181	GAAACCGAAGGCCAACYGCCKACTCACATCGGTTCWGARCTYTCWGTTGAAAGCSGATCTCGCK .V.RSDRMN..N.....D..R..N..Y.....Y..A...Y.DR.HRGYK.W...Y..H..MT	240 240
VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	241 241	GATGAAGATGAYGMKGTCGYSGARGATGAAGACGARGATGAAGAYGAAGAYGGCGACGGT ..Y..M..YAGTRAM.AYM.Y..YSWY.....Y..W..Y..V....RM...R..Y..HRRC	300 300
VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	301 301	GAAAGYAGCGACAGCGAAGGAAGTGGTATYGACCCCTGARCTSGCTCGTGAGAAATTG AGCRM.RVYRRYKMY.....DRYH..H..C..Y.....K..DYTA..R.....Y	360 360
VCVM-rpod.con 3,4,5-rpod.con	361 361	AATGAACCTGGCGGGYAAGTCCAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTGGCTGAC .CY.W..YAA.M.R.AY..RR.YY.W..RY.H..KAWM..Y..RCAY..YDAYR.B	420 420

卷之三

4
☒

gyrB-VC.con	1	GTMCCGGYGGTCTGCACGGGTAGGTTGGTGGTTAACGGCTYTCTGAAAAATG	60
gyrB-VM.con	1	...C.....T.....A.....A.....G..T..C..G..A.....	60
	** * * * *	***** *	
gyrB-VC.con	61	CTRCTYACCATYATCGGGYGGCAARATCCAYWCSCAAACTTACCATCATGGTGTGCCA	120
gyrB-VM.con	61	..G..B.....T.....T.....G..T..CA.C.....C.....	120
	* * * * * *	***** *	
gyrB-VC.con	121	CAAGCACCGTTGGCTGTRGGTGAAXACWGAGCGTACCGTACTACCGTTCTGG	180
gyrB-VM.con	121T.....G.....G.....T.....G.....G.....	180
	* * * * * *	***** *	
gyrB-VC.con	181	CCWAGYGCACARACYTTACCAATAATCGAATTYCATTACGACATTTCGGCTAAACGCC	240
gyrB-VM.con	181	..T..T....G..T.....C.....C.....C.....Y.....	240
	* * * * * *	***** *	
gyrB-VC.con	241	CGTGAGCTGTCAATTGAAAYTCTGGCGTGCATCAAGCTGAYCGATGAACGTGAAGAA	300
gyrB-VM.con	241C.....C.....CG.....G.....	300
	* * * * * *	***** *	
gyrB-VC.con	301	GATAAAAAGACCACCTCATGATGAAGGGGTATTCAAGCGTTGACCCACTTGAA	360
gyrB-VM.con	301G.....Y.....T.....K.....	360
	* * * * *	***** *	
gyrB-VC.con	361	CGYAAAYAAACGCCRATCCATGAGAAAGTCTTCCACTTAACCAAGGGCTGAAGATGGC	420
gyrB-VM.con	361	..T.....G.....A.....A.....C.....	420
	* * * * * *	***** *	

四〇七

5

図 5 → “[”]

rpoD-VC.con	421	AGTCATCAAGCTTCTGAAGCGTAGACTTAGTGYTGGATATCTTCCGTGAATTCGYCTA	480
rpoD-VM.con	421	...A.C.....A.....T...AG.C.G..AC.....Y.....C.....C...	480
***** * ***** * ***** * *** * * * * * * * * * * * * * * *			
rpoD-VC.con	481	ACACCAAGCAATTGACCACCTGGTTGAAACTCTGCCACTTCATGGATCGTGTGGC	540
rpoD-VM.con	481	...A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T	540
***** * ***** * ***** * *** * * * * * * * * * * * * * * *			
rpoD-VC.con	541	ACCCAAAGAACGTTGGTRATGAAAGCGCTAGTTGAAGTGCCTGGAAAGATGCCGAAGAAATCG	600
rpoD-VM.con	541	...G..Y.....G.....V..G.....V.....A.....A.....A.....A.....A	600
***** *			
rpoD-VC.con	601	TTCATGCCCTTACAGGCAAATGAATGAAAGAGTGGCTGGATAAAGTCCTTGCT	660
rpoD-VM.con	601	..T..T..Y..R.....R.....R.....R.....R.....R.....R.....C...	660
***** *			
rpoD-VC.con	661	TCTGACAAGCCTTACGTAGCGAAAGTCCGTGAGCAAAGAAAGAGATCCGCCGTTCAATTT	720
rpoD-VM.con	661T..R.....T...CAA.....A.....A.....C..T..T.....C.....C	720
***** *			
rpoD-VC.con	721	CAGAAACTACAATAATGATCGAGCAAGAGACATCACTGTCTGTTGAACGCCATCAAAGACATC	780
rpoD-VM.con	721	..A.....K..G.....A..R.....T.....G..T.....G..T.....G..T	780
***** *			
rpoD-VC.con	781	AGCCGTCGTATGTCATACTGGTAGGCCRAAAGCTGGCCGTGGC	822
rpoD-VM.con	781T.....A..G.....G.....G.....G.....G.....G.....G	822
***** *			

■ 6

gyrB-VM.con	1	GTCCTCCGGTGGTCTACACGGGTAGGTTGTCGGTAGTGAATGCCCTGTCAGAAAAAGTG	60
gyrB-VC.con	1	..M.....Y.....G.....G.....T...C..G..Y..T.....	60
	**	***** *	
gyrB-VM.con	61	CTGCTBACCATTTATCGTGGCAAGGATTCACACCCAAACTTACCATCACGGTGTGCCA	120
gyrB-VC.con	61	..R..Y....Y....Y....Y....R..C..YW.S.....T.....	120
	**	***** *	
gyrB-VM.con	121	CAAGCACCGTTGTCTGTRGTGGGTGAGACTGAGCGTACCGGTACCGTACCTTG	180
gyrB-VC.con	121G.....R.....K..W.....	180
	***** *		
gyrB-VM.con	181	CCTAGTGCACAGACTTTACCAAATACGAACATTACGACATCTGGCTAACGYCTG	240
gyrB-VC.con	181	..W..Y....R..Y.....Y.....T.....C...	240
	***** *		
gyrB-VM.con	241	CGTGAGCTGTCAATTCCCTGAACCTCTGGCGTGTGATCAAGCTGACGGATGAGCGTGAAGAA	300
gyrB-VC.con	241Y.....Y.....YC.....A.....	300
	***** *		
gyrB-VM.con	301	GATAAGAAAGACCACTTYATGTATGAAGGTGGTATTCAAGCGTTGTGACCCACTTGAAC	360
gyrB-VC.con	301A.....C.....G.....G.....	360
	***** *		
gyrB-VM.con	361	CGTAAYAAACGCCGATCCATTGAAAAAGTATTCCACTTCAACCAAGAGCGTGAAGATGGC	420
gyrB-VC.con	361	..Y.....R.....G.....T.....	420
	***** *		

卷之六

gyrB-VM.con	421	ATCAGCGTGGAACTGGCAATGGCACTGGGATGGTTCCAAGAAAACATCTACTGCTTT	480
gyrB-VC.con	421R.....Y.....*	480
gyrB-VM.con	481	ACCAACAACATYCCACAGCGTGAATGGGGTACCCACTTAGCYGGTTCCGTGGCRTTG	540
gyrB-VC.con	481	..Y.....C.....T.....Y.....C.....G.....	540
gyrB-VM.con	541	ACCCGTACTTGAACAACATGGACAAGAAGGCTTCGAAAGAAAGCSAAGCRGCA	600
gyrB-VC.con	541Y.....Y.....*	600
gyrB-VM.con	601	ACCTCGGGTGTATGATGCCGTGAAGGCTTAACRGCRGKGTKTGGTCAAAGTRCCRGAT	660
gyrB-VC.con	601G.....W.....G.....W.....G.....G.....	660
gyrB-VM.con	661	CCTAAATTCTCRAGCCAAACCAAGATAAGCTRGTTCGGGARGTGAATCCGGGTT	720
gyrB-VC.con	661G.....A.....A.....R.....	720
gyrB-VM.con	721	GAGTCAGCCATGAATGAGAACGCTGGGGATTTCCTGGCGAAAACCCAAGCGAAGGAAA	780
gyrB-VC.con	721	..R.....Y.....R.....A.....	780
gyrB-VM.con	781	AACGTTGTTGAAAGATATTGATGCRGCRCGHGCTCGTGAAGCVGGCGTAAAGCACGT	840
gyrB-VC.con	781Y.....K.....S.....C..K.....	840
gyrB-VM.con	841	GAAATGACYCGTCGTAAGGGCGCGTAGAYTMGCTGGTTGCCW	885
gyrB-VC.con	841T...Y.....Y.G..TC.T..W..C..A..C	885

図 7

rpoD-VM.con	1	ACACGTGAAGGCCAATCGATAATTGCCAAGGCCATTGAAGGATGGTATTAAACCAAGTTCAA	60
rpoD-VC.con	1T..... *****	60
 ● ● ● ● ●			
rpoD-VM.con	61	AGTGGCGATTGCTGAGGTATCCTGGAACCATACTCCCATACATTCTTGAAACAGTTGACAAGGT	120
rpoD-VC.con	61 *****	120
 ● ● ● ● ●			
rpoD-VM.con	121	CAGGCCAGAAGAACTACGTCTGACTGAYCTGATTTCGTTGATCCTAACCGACATG	180
rpoD-VC.con	121C.....G.....C.....C.....A.....Y..... *****	180
 ● ● ● ● ●			
rpoD-VM.con	181	GAAACCGAAGGCCCAACTGCTACTCACATCGGTTAGARCTCTGAAGCCGATCTCGCT	240
rpoD-VC.con	181C..G.....T..G..T.....G.....G.....G	240
 ● ● ● ● ●			
rpoD-VM.con	241	GATGAAAGATGACGGAGTGTCCGGGAGATGAAGAACGAGGATGAAGATGAAGACGGGCAGGGT	300
rpoD-VC.con	241T..CT.....TC..A.....A.....C.....T..... *****	300
 ● ● ● ● ●			
rpoD-VM.con	301	GAAAGYAGCCGACAGCGAAGGAAGTGGGTATTGACCCCTGAGCTCGTGAAGAAATTG	360
rpoD-VC.con	301C.....C.....A..G..... *****	360
 ● ● ● ● ●			
rpoD-VM.con	361	AATGAACTGCGGGCAAGTCCAAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTGGTCGTGAC	420
rpoD-VC.con	361Y..... *****	420

図 7 → 7' 3'

rPOD-VM.con	421	AGTAACCAAGGCATCTGAAGCTCAAGCCTGGTACTGGATATYTTCCGGAAATCCGCCATA	480
rPOD-VC.con	421	...C.T.....T.....G...GA.T.A..GY.....C.....T.....Y... *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	480
rPOD-VM.con	481	ACACCAAACAATTGACCATTGGTTGAAACTCTGGTACCTCGATGGATCGTGTTCGTT	540
rPOD-VC.con	481G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	540
rPOD-VM.con	541	ACCCAAGAGCGYTTGGTGTGAAAGCVGGGGTGAAAGTCGGCAAAGAAATCA	600
rPOD-VC.con	541A...T.....R.....G...A.....G.....G.....G.....G.....G *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	600
rPOD-VM.con	601	TITATTGCYCCTRTTTACAGGCAATGAATCGAATGARGAATGGCTYGATAAGTRCTCGCT	660
rPOD-VC.con	601	...C..C..C..A... *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	660
rPOD-VM.con	661	TCTGATAARCCCTTATGTACAAAAGTACGTGAGCAAGAACGATAATTGCCGCTCAATC	720
rPOD-VC.con	661C...G.....C...GCG.....C.....A...G...C.....T.....T *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	720
rPOD-VM.con	721	CAAAAACTKCAGATGATCGAACARGAGACTTCACCTGTGAGC GTATCAAAAGACATC	780
rPOD-VC.con	721	...G.....A...A.....G...A.....A.....A.....C..... *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	780
rPOD-VM.con	781	AGCCGGTGGTATGTCCTATCGGTGAAGCGAAAGCTGGCGTGGC	822
rPOD-VC.con	781A.....G..R..... *** * *** * *** * *** * *** * *** * *** * ***	822

SEQUENCE LISTING

<110> Nichirei Corporation

<120> Primers and probes for detection of vibrio cholera or vibrio mimicus and method of using thereof

<130> PH-1967-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002/362878

<151> 2002-12-13

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio cholera and vibrio mimicus -gyrB

<400> 1

gtmtccggyg gtctracgg gtaggtgtg tcggtrgtka aygcstbtc waaaaagtg 60
ctrctbacca tytatcgygg yggcaaraty caywscsaaa cttaccatca yggtgtgcc 120
caaggcaccgt tgkctgtrgt rggtgakacw gagcgtaccg gtactaccgt acgtttctgg 180
ccwagygcac aracyttac caatatcgaa ttcattacg acattytggc taaacgyctg 240
cgtgagctgt cattcctgaa ytctggcgtg tcgatcaagc tgaysgatga rcgtgaagaa 300
gataaraaag accacttyat gtatgaaggk ggtattcaag cggttgtkac ccacttgaac 360
cgyaayaaaa cgccratcca tgaraaagt m ttccacttya accaagagcg tgaagatggc 420
atcagcgtgg aagtggcrat gcagtggaay gatggttcc aagaaaacat ctactgctt 480
acyaacaaca tyccacagcg tcatggggtt acccayttag cyggttccg tggcrttg 540
acccgtactt tgaacaacta yatggayaaa gaaggcttct cgaagaaaagc scaagcrgca 600
acctcgggtg atgatgecg tgaaggctta acrgcdgtkg tdtcggtgaa agtrccrgat 660
cctaaattct cragccaaac caaagataag ctrgtttctt cggargtraa atccgcrgtt 720
gartcagcya tgaatgagaa gctggcrgat ttcctrccgg aaaacccaag cgaagcgaaa 780
aacgtttttt cgaagattat tcatgcrgcr cghgckcgtg aagcvgcgcg taaagcmcgk 840
gaaatgacyc gycgtaaagg cgcgytrgay ythgcwggyt trcch 885

<210> 2

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio cholera and vibrio mimicus -rpoD

<400> 2

acacgtgaag gygaaatcga tattgccaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
agtgcgattt ctgagtatcc tggaaaccatc ccwtayattc ttgarcagtt tgaymrkgtt 120

caggcmaag arctacgtct sactgayctg atttcwggtt tcgttgaycc taacgacatg 180
gaaaccgaag cgccaacygc kactcacatc gttcwgarc tytctgaagc sgatctcgck 240
gatgaagatg aygmkgtcgy sgargatgaa gacgargatg aagaygaaga yggcgacggt 300
gaaagyagcg acagcgaaga agaagtsggt atygaccctg arctsgctcg tgagaaattc 360
aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggcgtgac 420
agtmaycaag cwtctgaagc ktcarrcytr gtrytgata tyttccgyga attccgycta 480
acaccaaarc aattygacca yttggttgaa actctgcgya cytcratgga tcgtgtcgy 540
acccaagarc gyttggtrat gaaagcvgr gttgaagtgc cgaaratgcc raagaaatcr 600
ttyatygcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargart ggctbgataa agtvctygc 660
tctgayaarc ctaygtasm raaagtmcgt gagcaagaag amgakatygc ccgytcaaty 720
caraaaactdc aratgatcga rcargagacw tcactgtctg ttgarcgyat caaagacatc 780
agccgtcgta tgtcwatcgg tgargcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 3

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence vibrio cholera-gyrB

<400> 3

acacgtgaag gygaaatcga tattgccaag cgcattgaag atggattaa ccaagttcaa 60
agtgcgattt ctgagtatcc tggAACCATC ccwtayattc ttgarcagtt tgaymrkgtt 120
caggcmaag arctacgtct sactgayctg atttcwggtt tcgttgaycc taacgacatg 180
gaaaccgaag cgccaacygc kactcacatc gttcwgarc tytctgaagc sgatctcgck 240
gatgaagatg aygmkgtcgy sgargatgaa gacgargatg aagaygaaga yggcgacggt 300

gaaagyagcg acagcgaaga agaagtsggt atygaccctg arctsgctcg tgagaaaattc 360
aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgtgac 420
agtmaycaag cwtctgaagc ktcarrcytr gtrytggata tyttccgyga attccgycta 480
acaccaaarc aattygacca yttggttgaa actctgcgya cytcratgga tcgtgttcgy 540
acccaagarc gyttggtrat gaaagcvgr gttgaagtgc cgaaratgcc raagaaaatcr 600
ttyatygcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargart ggctbgataa agtvctygc 660
tctgayaarc ctaygtasm raaagtmcggt gagcaagaag amgakatygc ccgytcaaty 720
caraaaactdc aratgatcga rcargagacw tcactgtctg ttgarcgat caaagacatc 780
agccgtcgta tgtcwatcgg tgargcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 4

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio cholera -rpoD

<400> 4

acacgtgaag gtgaaatcga tattgccaag cgcatgttgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
agtgcgattt ctgagtatcc tggaaccatc ccttatattc ttgagcagtt tgatcgtgtt 120
caggccgaag agctacgtct cactgacactg atttcaggtt tcgttgaycc taacgacatg 180
gaaaccgaag cgccaaaccgc gactcacatc ggttctgagc tttctgaagc ggatctcgcg 240
gatgaagatg atgctgtcgt cgaagatgaa gacgaagatg aagacgaaga tggcgacggt 300
gaaagcagcg acagcgaaga agaagtgcgtt atcgaccctg aactggctcg tgagaaaattc 360
aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgtgac 420
agtcatcaag cttctgaagc gtcagactta gtgytggata tcttccgtga attccgycta 480
acaccaaaggc aattcgacca cttggttgaa actctgcgc cttcaatgga tcgtgttcgc 540

acccaagaac gtttggtrat gaaagcggta gttgaagtgc cgaagatgcc gaagaaatcg 600
ttcatcgccc tatttacagg caatgaatcg aatgaagagt ggctggataa agtccttgct 660
tctgacaagc cttagctacgtac gaaagtccgt gagcaagaag aagagatccg ccgttcaatt 720
cagaaaactac aaatgatcga gcaagagaca tcactgtctg ttgaacgcatt caaagacatc 780
agccgtcgta tgtcaatcgg tgaggcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 5

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of *vibrio mimicus* -gyrB

<400> 5

gtctccggtg gtctacacgg ggttaggtgtg tcggtagtgta atgccctgtc agaaaaagtg 60
ctgctbacca tttatcgtgg tggcaagatt cacacccaaa cttaccatca cggtgtgcca 120
caagcacccgt tgtctgtrgt gggtgagact gagcgtaccg gtactaccgt acgtttctgg 180
cctagtgcac agactttac caatatcgaa ttccattacg acattctggc taaacgyctg 240
cgtgagctgt cattcctgaa ctctggcgtg tcgatcaagc tgacggatga gcgtgaagaa 300
gataagaaag accacttyat gtatgaaggt ggtattcaag cgtttgtkac ccacttgaac 360
cgtaayaaaa cggcgatcca tgaaaaagta ttccacttca accaagagcg tgaagatggc 420
atcagcgtgg aagtggcaat gcagtggAAC gatggTTCC aagaaaaacat ctactgcttt 480
accaacaaca tyccacagcg tgatggcggt acccacttag cyggTTCCG tgggcrttg 540
acccgtactt tgaacaacta catggacaaa gaaggcttct cgaagaaagc scaagcrgca 600
acctcgggtg atgatgcgcg tgaaggctta acrgcrgtkg tktcggtgaa agtrccrgat 660
cctaaattct cragccaaac caaagataag ctrgTTTCTT cggargtgaa atccgcgggtt 720
gagtcagcca tgaatgagaa gctggcggtt ttcctggcgg aaaacccaag cgaagcgaaa 780

aacgtttgtt cgaagattat tcatgcrgcr cghgctcgtg aagcvgcgcg taaagcacgt 840
gaaatgacyc gtcgtaaagg cgcgctagay ytmgctggtt tgccw 885

<210> 6

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: consensus sequence of *vibrio mimicus* -rpoD

<400> 6

acacgtgaag gcgaaatcga tattgccaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
agtgcgattt ctgagtatcc tggaaccatc ccatacatc ttgaacagtt tgacaagggtt 120
caggcagaag aactacgtct gactgayctg atttctggtt tcgttgatcc taacgacatg 180
gaaaccgaag cgccaactgc tactcacatc gttcagarc tctctgaagc cgatctcgct 240
gatgaagatg acgaggtcgc ggaggatgaa gacgaggatg aagatgaaga cggcgacggt 300
gaaagyagcg acagcgaaga agaagtgggt attgaccctg agctcgctcg tgagaaattc 360
aatgaactgc gcggcaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgac 420
agtaaccaag catctgaagc ttcaaggctg gtactggata tyttccgcga attccgccta 480
acacccaaaac aatttgcacca tttgggtgaa actctgcgtc cctcgatgga tcgtgttcgt 540
acccaagagc gyttgggtgat gaaagcvgtg gttgaagtgc cgaaaatgcc aaagaaaatca 600
tttattgcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargaaat ggctygataa agtrctcgct 660
tctgataarc cttatgtaca aaaagtacgt gagcaagaag acgatattcg ccgctcaatc 720
caaaaaactkc agatgatcga acargagact tcactgtctg ttgagcgtat caaagacatc 780
agccgtcgta tgtctatcgg tgaagcgaaa gctcgccgtg cg 822

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/31, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed, EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq,
SwissProt/PIR/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Yoko NISHIYAMA et al., "rpoD Idenshi Enki Hairetsu ni yoru Bunshi Keito Kaiseki ni Motoduita Vibrio vulnificus Tokui Kenshutsu PCR Primer no Sekkei", Dai 23 Kai Japanese Society of Food Microbiology Gakujutsu Sokai Koen Yoshishu, 24 September, 2002 (24.09.02), page 42	7-12, 21-26, 35-40/ 1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	Yuji KOIZUMI et al., "rpoD Idenshi Hairetsu ni yoru Bunshi Keitou Kaiseki ni Motoduita Choen Vibrio Tokui Kenshutsu PCR Primer no Sekkei", Dai 22 Kai Japanese Society of Food Microbiology Gakujutsu Sokai Koen Yoshishu, 18 October, 2001 (18.10.01), page 36	1-6, 13-20, 27-34, 41-42

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 January, 2004 (13.01.04)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2004 (27.01.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15889

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Vuddhakul V. et al., Analysis of gyrB and toxR gene sequence of Vibrio hollisae and development of gyrB-and toxR-targeted PCR methods for isolation of V. hollisae from the environment and its identification., Applied and Environmental Microbiology, February, 2000, Vol.66, No.8, pages 3506 to 3514	1-6,13-20, 27-34,41-42
Y	Venkateswaran K., et al., Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of Vibrio Parahaemolyticus and its application in detection of this pathogen in shrimp., Applied and Environmental Microbiology, February, 1998, Vol.64, No.2, pages 681 to 687	1-6,13-20, 27-34,41-42
Y	WO 97/35970 A1 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.), 02 October, 1997 (02.10.97), & EP 965636 A1 & JP 09-252783 A & US 6048697 A & CA 2249183 A	1-6,13-20, 27-34,41-42
Y	YAMAMOTO S., et al., Phylogenetic structures of the genus Acinetobacter based on gyrB sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization., Int.J.Syst.Bacteriol.January, 1999, Vol.49, pages 87 to 95	1-42
Y	JP 08-256798 A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 08 October, 1996 (08.10.96), (Family: none)	1-42
Y	JP 07-213299 A (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 15 August, 1995 (15.08.95), (Family: none)	1-42
Y	Heidelberg JF. et al., DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae., Nature, August, 2000, Vol.406, pages 477 to 483	1-42
A	JP 05-276996 A (Toyobo Co., Ltd.), 26 October, 1993 (26.10.93), (Family: none)	1-42
P,A	WO 03/014393 A1 (NICHIREI CORP.), 20 February, 2003 (20.02.03), & JP 2003-047474 A	1-42

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/31, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/31, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JST Plus (JOIS), PubMed
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	西山葉子他, <i>rpoD</i> 遺伝子塩基配列による分子系統解析に基づいた <i>Vibrio vulnificus</i> 特異検出 PCR プライマーの設計, 第 23 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 2002.09.24, 第 42 頁	7-12, 21-26, 35-40 / 1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	小泉雄史他, <i>rpoD</i> 遺伝子配列による分子系統解析に基づいた腸炎ビブリオ特異検出 PCR プライマーの設計, 第 22 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 2001.10.18, 第 36 頁	1-6, 13-20, 27-34, 41-42

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 01. 2004

国際調査報告の発送日

27. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官(権限のある職員)

北村 弘樹

印

4B 9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Vuddhakul V, et al. Analysis of <i>gyrB</i> and <i>toxR</i> gene sequence of <i>Vibrio hollisae</i> and development of <i>gyrB</i> - and <i>toxR</i> -targeted PCR methods for isolation of <i>V. hollisae</i> from the environment and its identification. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , February 2000, Vol.66, No.8, p.3506-3514	1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	Venkateswaran K, et al. Cloning and nucleotide sequence of the <i>gyrB</i> gene of <i>Vibrio Parahaemolyticus</i> and its application in detection of this pathogen in shrimp. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , February 1998, Vol.64, No.2, p.681-687	1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	WO 97/35970 A1 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.) 1997.10.02 & EP 965636 A1 & JP 09-252783 A & US 6048697 A & CA 2249183 A	1-6, 13-20, 27-34, 41-42
Y	Yamamoto S, et al. Phylogenetic structures of the genus <i>Acinetobacter</i> based on <i>gyrB</i> sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> January 1999, Vol.49, p.87-95	1-42
Y	JP 08-256798 A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1996.10.08 (ファミリーなし)	1-42
Y	JP 07-213299 A (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1995.08.15 (ファミリーなし)	1-42
Y	Heidelberg JF, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen <i>Vibrio cholerae</i> . <i>Nature</i> , August 2000, Vol.406, p.477-483	1-42
A	JP 05-276996 A (東洋紡績株式会社) 1993.10.26 (ファミリーなし)	1-42
P, A	WO 03/014393 A1 (NICHIREI CORPORATION) 2003.02.20 & JP 2003-047474 A	1-42